

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 MARS 1999

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa  
N° 55-1328

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **14.04.98**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **98 04638**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**  
DATE DE DÉPÔT **14 AVR. 1998**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET REGIMBEAU**  
**26, Avenue Kléber**  
**75116 PARIS**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire  
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale  
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent : **237082 D17469 MIP** références du correspondant : **01 45 00 92 02** téléphone

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**Nouvelles constructions pour l'expression contrôlée de protéines recombinantes dans des cellules procaryotes**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**PIERRE FABRE MEDICAMENT**

Forme juridique

**SOCIÉTÉ ANONYME**

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

**45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE**

Pays

**FR**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

**921169**

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 04 638

TITRE DE L'INVENTION : Nouvelles constructions pour l'expression  
contrôlée de protéines recombinantes dans des cellules  
procaryotes

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

PIERRE FABRE MEDICAMENT

45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

CHEVALET Laurent

2, rue des Acacias

74100 Annemasse, FR

ROBERT Alain

12, rue de Romagny

74100 Annemasse, FR

BONNEFOY Jean-Yves

Les Noyers

74250 Le Sappey, FR

NGUYEN Thien Ngoc

7, rue Les Petits Hutins

Lathoy

74160 Saint Julien en

Genevois, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

14 avril 1998

CABINET REGIMBEAU



921169.

NOUVELLES CONSTRUCTIONS POUR L'EXPRESSION CONTROLEE DE  
PROTEINES RECOMBINANTES DANS DES CELLULES PROCARYOTES.

L'invention comprend une nouvelle construction pour  
5 l'expression d'un gène codant pour une protéine  
recombinante d'intérêt placé sous le contrôle du  
promoteur de l'opéron tryptophane Ptrp dans une cellule  
hôte procaryote, caractérisée en ce que la construction  
comprend une séquence nucléique capable d'inactiver le  
10 gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite  
séquence nucléique est introduite dans ladite cellule  
hôte, des vecteurs contenant ladite construction et les  
cellules hôtes transformées par lesdits vecteurs.  
L'invention a également pour objet les procédés de  
15 production desdites protéines recombinantes utilisant ces  
nouvelles constructions.

La présente invention s'applique de manière générale  
à la production de protéines ou de polypeptides  
recombinants par des méthodes dites de l'ADN recombinant.  
20 Plus particulièrement, la présente invention concerne la  
production de protéines ou de polypeptides recombinants  
par des cellules hôtes transformées de type bactérien et  
dont l'expression est dirigée ou est sous le contrôle du  
promoteur / opérateur Ptrp de l'opéron tryptophane  
25 (Nichols & Yanofsky, 1983).

*Escherichia coli* ( *E. coli* ) est l'organisme le plus  
couramment utilisé et le mieux caractérisé dans un but de  
production de protéines recombinantes. Différents  
systèmes d'expression sont employés dans *E. coli* et,  
30 parmi eux, le promoteur Ptrp de l'opéron tryptophane est  
considéré comme l'un des plus forts (Yansura & Bass,  
1997).

Cependant, tous les gènes recombinants ne sont pas  
exprimés avec la même efficacité par *E. coli*. Il a été  
35 décrit et observé que l'accumulation d'une protéine  
recombinante produite lors de la culture de cellules  
hôtes transformées pouvait rapidement conduire à une  
instabilité plasmidique, à une diminution voire même un

arrêt de la croissance cellulaire et à une diminution du rendement global en produit recombinant. Dans ce cas, il est important de disposer d'un système d'expression contrôlée et régulée permettant de diviser le procédé de production en deux phases, une première dite de croissance cellulaire où l'activité du promoteur est minimale, suivie d'une phase dite d'induction ou de dérégulation privilégiant l'expression et l'accumulation de la protéine recombinante.

10       Ptrp, le promoteur de l'opéron tryptophane d'*E. coli*, est adapté à la production de protéines recombinantes du fait de son caractère inductible. La répression au niveau de l'opérateur de Ptrp est assurée par le produit du gène régulateur *trpR* lorsque ce produit, également nommé aporépresseur *trp*, est lié au tryptophane (co-répresseur). L'absence de tryptophane rend la protéine TrpR incapable de se lier à l'opérateur, provoquant ainsi une dérégulation de l'opéron tryptophane. Divers exemples d'expression de gènes hétérologues sous le contrôle de Ptrp montrent que la fuite d'expression y est trop importante pour permettre la production, dans des conditions satisfaisantes de protéines recombinantes, notamment celles qui sont toxiques pour la cellule (Yansura et Henner, 1990).

25       La protéine régulatrice TrpR est soumise à un mécanisme d'auto-régulation (Kelley & Yanofsky, 1982) et sa concentration tend vers une valeur moyenne de 120 molécules par cellule d'*E. coli* K-12 en présence d'un excès de tryptophane exogène (Gunsalus, Gunsalus Miguel, & Gunsalus, 1986). Cette concentration, si elle est suffisante pour réguler correctement l'activité de l'unique promoteur chromosomique Ptrp, peut s'avérer limitante face à plusieurs dizaines de vecteurs contenant le même promoteur. Quant au tryptophane, il peut aussi être un facteur limitant même s'il est apporté en excès dans le milieu de culture. Il existe en effet chez *E. coli* une activité tryptophanase codée par le gène *tnaA* et capable de dégrader le tryptophane en indole, le

détournant ainsi de sa fonction régulatrice (Snell, 1975). De plus, la tryptophanase est inductible par le tryptophane, ce qui rend vaine toute tentative de compenser ce phénomène de dégradation par une  
5 augmentation de l'apport en tryptophane.

Différentes approches visant à contrôler au mieux la fuite d'expression ont été envisagées et décrites. Cependant, certaines ont l'inconvénient d'être seulement applicables à l'échelle du laboratoire (Hasan &  
10 Szybalski, 1995; Suter-Crazzolara & Unsicker, 1995) ou de diminuer le rendement en produit recombinant (Stark, 1987).

Par conséquent, il existe aujourd'hui un grand besoin à développer un système d'expression de protéines  
15 recombinantes d'intérêt contrôlée et utilisable à grande échelle et permettant en particulier de contrôler la fuite d'expression. Ceci est justement l'objet de la présente invention.

20 L'invention concerne de nouvelles constructions basées sur le système d'expression Ptrp qui lorsqu'elles sont introduites dans une cellule hôte procaryote, de préférence de type bactérien, permettent de réduire l'expression résiduelle de gènes recombinants en début de  
25 culture, ces nouvelles constructions apportant un contrôle amélioré de la synthèse de protéines recombinantes.

La présente invention a pour objet une construction pour l'expression d'un gène codant pour une protéine  
30 recombinante d'intérêt placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron tryptophane Ptrp dans une cellule hôte procaryote, caractérisée en ce que la construction comprend une séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite  
35 séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte.

Par protéine recombinante d'intérêt, on entend désigner toutes protéines, polypeptides ou peptides obtenus par recombinaison génétique, et susceptibles

d'être utilisés dans des domaines tels que celui de la santé humaine ou animal, de la cosmétologie, de la nutrition humaine ou animale, de l'agro-industrie ou de l'industrie chimique. Parmi ces protéines d'intérêt on  
5 peut citer en particulier mais sans s'y limiter:

- une cytokine et notamment une interleukine, un interféron, un facteur de nécrose tissulaire et un facteur de croissance et notamment hématopoïétique (G-CSF, GM-CSF), une hormone telle que l'hormone de  
10 croissance humaine ou l'insuline, un neuropeptide,

- un facteur ou cofacteur impliqué dans la coagulation et notamment le facteur VIII, le facteur von Willebrand, l'antithrombine III, la protéine C, la thrombine et l'hirudine,

- 15 - une enzyme et notamment la trypsine, une ribonucléase et la  $\beta$ -galactosidase,

- un inhibiteur d'enzyme telle que l' $\alpha 1$  anti-trypsine et les inhibiteurs de protéases virales

- une protéine capable d'inhiber l'initiation ou  
20 la progression de cancers, tels que les produits d'expression de gènes supresseurs de tumeurs, par exemple le gène P53,

- une protéine capable de stimuler une réponse immunitaire ou un anticorps, tels que par exemple les  
25 protéines, ou leurs fragments actifs, de la membrane externe de bactérie Gram négatif, en particulier les protéines OmpA de Klebsiella ou la protéine G du virus respiratoire syncytial humain,

- une protéine capable d'inhiber une infection  
30 virale ou son développement,  
par exemple les épitopes antigéniques du virus en cause ou des variants altérés de protéines virales susceptibles d'entrer en compétition avec les protéines virales natives,

- 35 - une protéine susceptible d'être contenue dans une composition cosmétique telle que la substance P ou une superoxyde dismutase,

- une protéine alimentaire



- une enzyme capable de diriger la synthèse de composés chimiques ou biologique, ou capable de dégrader certains composés chimiques toxiques, ou encore

- toute protéine ayant une toxicité vis à vis du  
5 micro-organisme qui la produit, en particulier si ce micro-organisme est la bactérie *E. coli*, comme par exemple, mais sans s'y limiter, la protéase du virus VIH-1, la protéine ECP (ECP pour "Eosinophile Cationic Protein") ou les protéines 2B et 3B du poliovirus.

10 Par séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte, on entend désigner une séquence nucléique capable de modifier ledit gène de telle sorte que cette  
15 modification entraîne la perte de l'activité tryptophanase de ladite cellule hôte, le produit d'expression dudit gène modifié étant incapable de dégrader le tryptophane en indole, le détournant ainsi de sa fonction régulatrice. Parmi lesdites séquences  
20 nucléiques capables d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque une desdites séquences nucléiques est introduite dans ladite cellule hôte, on préfère une séquence nucléique codant pour une tryptophanase TnaA inactivée obtenue par mutation telle  
25 que par substitution, insertion et/ou délétion d'au moins un nucléotide de la séquence nucléique codant pour une tryptophanase TnaA active.

L'invention comprend une construction selon l'invention, caractérisée en ce que la cellule hôte  
30 procaryote est une bactérie Gram négative, de préférence appartenant à l'espèce *E. coli*.

L'invention concerne également une construction selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre en amont de ladite séquence nucléique capable  
35 d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte, tout ou partie de la séquence nucléique du promoteur P<sub>tna</sub> de l'opéron tryptophanase.

De préférence l'invention est relative à une construction selon l'invention, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite  
5 séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte comprend un fragment muté de la séquence codante de ladite tryptophanase TnaA.

De manière préférée, l'invention est relative à une construction selon l'invention, caractérisée en ce que  
10 ledit fragment muté est obtenu par l'insertion d'un codon stop à une position telle que la séquence du fragment muté ainsi obtenu code pour un fragment protéique dépourvu d'activité tryptophanase.

De manière tout aussi préférée, l'invention est  
15 relative à une construction selon l'invention, caractérisée, caractérisée en ce que ledit fragment muté est un fragment muté de la séquence codante de la tryptophanase TnaA de ladite cellule hôte.

Pour ce qui concerne la séquence nucléique codant  
20 pour la tryptophanase TnaA de *E. coli*, et à son promoteur Ptna, on se référera dans la présente description à la séquence publiée par Deeley et Yanofsky (1981).

Pour ce qui concerne les séquences nucléiques codant pour le promoteur/opérateur Ptrp de l'opéron tryptophane,  
25 on se référera à la séquence publiée par Yanofsky et al. (1981).

L'invention concerne également une construction selon l'invention, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une  
30 tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte comprend une séquence nucléique comprenant tout ou partie de la séquence d'un promoteur suivie en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou  
35 protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp.

De préférence l'invention est relative à une construction selon l'invention, caractérisée en ce que ledit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou

protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp est tout ou partie du promoteur Ptna de l'opéron tryptophanase d'*E. coli*.

De manière également préférée, l'invention comprend  
 5 une construction selon l'invention, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp, est la séquence codant pour l'aporépresseur TrpR de l'opéron tryptophane  
 10 d'*E. coli* ou un de ses fragments biologiquement actifs telle que celle décrite par Gunsalus et Yanofsky (1980).

On entend désigner par une séquence nucléique comprenant tout ou partie de la séquence d'un promoteur, une séquence nucléique comprenant toute la séquence d'un  
 15 promoteur, ou un de ses fragments biologiquement actifs, capable de diriger ou de contrôler l'expression d'un gène qui lui est relié de manière fonctionnelle.

On entendra désigner dans la présente description par fragment biologiquement actif d'un promoteur, toute  
 20 séquence d'un fragment dudit promoteur, lequel fragment est capable de diriger ou de contrôler l'expression du gène situé en aval dudit fragment, ledit gène étant relié de manière fonctionnelle audit fragment.

On entendra désigner dans la présente description par fragment biologiquement actif de l'aporépresseur TrpR de l'opéron tryptophane, tout fragment dudit  
 25 aporépresseur ayant conservé son activité répresseur

Par séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique agissant négativement sur le  
 30 promoteur Ptrp, on préfère les ribonucléotidiques choisis parmi les séquences suivantes:

a) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC - 3'

b) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC AGCACAACGC  
 GCCUGUCACC GGAUGUGUUU UCCGGUCUGA UGAGUCCGUG AGGACGAAAC  
 35 AGG - 3'

c) 5' - AUUCAGUACG AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU  
 UUUACGUGAA CUU - 3'

d) 5' - AUUCAGUACG AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU  
 UUUACGUGAA CUUAGCACAA CGCGCCUGUC ACCGGAUGUG UUUUCCGGUC  
 UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACAGG-3'

e) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC AUUCAGUACG  
 5 AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU UUUACGUGAA CUU-3'

f) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC AUUCAGUACG  
 AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU UUUACGUGAA CUUAGCACAA  
 CGCGCCUGUC ACCGGAUGUG UUUUCCGGUC UGAUGAGUCC GUGAGGACGA  
 AACAGG-3'

10 g) 5' - CUUCGCGUCC UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACGGCUUCC-3'

h) 5' - CUUCGCGUCC UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACGGCUUCC  
 AGCACAACGC GCCUGUCACC GGAUGUGUUU UCCGGUCUGA UGAGUCCGUG  
 AGGACGAAAC AGG-3'

15 Un autre aspect de l'invention concerne un vecteur  
 contenant une construction selon l'invention.

De manière préférée, le vecteur selon l'invention  
 est caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur  
 pMAK705[tnaAt] ou du vecteur pMAK705[Ptna::trpR::3'tna].

20 L'invention concerne également une cellule hôte  
 procaryote, de préférence une bactérie de l'espèce *E.*  
*coli.*, transformée par un vecteur selon l'invention.

Sous un autre aspect, l'invention a pour objet un  
 25 procédé de production de protéine recombinante dans une  
 cellule hôte utilisant une construction selon  
 l'invention.

L'invention a également pour objet un procédé de  
 production d'une protéine recombinante d'intérêt selon  
 30 l'invention, dans lequel ladite construction est  
 introduite dans l'ADN de la cellule hôte procaryote.

On préfère un procédé de production de protéines  
 recombinantes selon l'invention, dans lequel ladite  
 construction est introduite dans l'ADN de la cellule hôte  
 35 procaryote par un vecteur selon l'invention, de  
 préférence selon la méthode d'intégration chromosomique  
 décrite dans l'exemple 1 ou 2.

L'invention a en outre pour objet un procédé de production de protéines recombinantes selon l'invention, dans lequel ladite construction est introduite sans autre élément d'ADN qui permettrait d'y associer un avantage  
5 sélectif.

De manière préférée, l'invention comprend un procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'invention, dans lequel ladite construction est introduite au locus de l'opéron tryptophanase d'*E. coli*,  
10 de préférence au locus du gène *tna*, mieux encore au locus du gène *tnaA*.

On préfère un procédé de production de protéines recombinantes d'intérêt selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- 15 a) la transformation d'une cellule procaryote par un vecteur selon l'invention, et l'intégration de ladite construction dans l'ADN de ladite cellule hôte ;
- b) la transformation de ladite cellule procaryote  
20 par un vecteur contenant un gène codant pour ladite protéine recombinante d'intérêt
- c) la culture de ladite cellule transformée dans un milieu de culture permettant l'expression de la protéine recombinante; et
- 25 d) la récupération de la protéine recombinante à partir du milieu de culture ou de ladite cellule transformée.

L'invention a en outre pour objet un procédé de production de protéines recombinantes d'intérêt selon  
30 l'invention, caractérisé en ce que ledit procédé comprend en outre entre l'étape a) et b) du procédé ci-dessus, une étape de résolution et de criblage.

L'invention est relative en outre à un procédé de production de protéines recombinantes d'intérêt selon  
35 l'invention, dans lequel le contrôle de l'expression des protéines recombinantes avant induction du promoteur *P<sub>trp</sub>* est obtenu par l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de

nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp selon l'invention.

Enfin, l'invention comprend également un procédé de production selon l'invention, dans lequel l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique  
5 codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp selon l'invention est obtenue par tout moyen permettant d'exercer un effet inhibiteur ou activateur sur ledit  
10 promoteur.

De préférence, l'invention comprend un procédé de production selon l'invention, dans lequel l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique  
15 codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp selon l'invention est obtenue soit:

- a) par le choix d'une source de carbone appropriée dans le milieu de culture; soit
  - b) par l'ajout de tryptophane dans le milieu de  
20 culture; ou
- par une combinaison de a) et b).

Les systèmes de constructions, de vecteurs, les cellules hôtes procaryotes transformées par lesdits  
25 vecteurs ainsi que les procédés de l'invention décrits ci-dessus et qui seront exemplifiés dans les exemples ci-après ici entrent dans le cadre du contrôle de la production de protéines recombinantes dans des cellules procaryotes. Ils sont adaptés à l'expression de gènes  
30 homologues ou hétérologues placés en aval du promoteur / opérateur Ptrp. Deux mutants sont plus particulièrement décrits ci-après pour illustrer l'invention. Ils portent les noms ICONE 100 et ICONE 200 (ICONE pour Improved Cells for Over- and Non-leaky Expression). Les  
35 modifications introduites dans la lignée ICONE présentent les caractéristiques suivantes :

- 1) elle sont intégrées dans le chromosome de l'hôte,
- 2) étant générées par une technique de mutagenèse dirigée, elles sont ciblées à un endroit unique de l'ADN

bactérien, parfaitement connu puisqu'il s'agit de l'opéron *tna* situé à 83 min sur la carte physique du génome d'*E. coli* K-12. En cela, les conséquences sur le plan physiologique pour l'hôte sont parfaitement  
5 identifiées. En particulier, la possibilité que des fonctions cryptiques soient réactivées suite à l'intégration chromosomique - comme cela est suspecté dans le cas de la mutagenèse aléatoire - est écartée,  
3) la technologie employée dans ces exemples pour  
10 l'intégration chromosomique (Hamilton et al. (1989)) exclut la possibilité que d'autres séquences s'insèrent dans l'ADN bactérien. Notamment, les mutants ne portent pas de gène de résistance à un antibiotique. Dans le cas où ils seraient utilisés à l'échelle industrielle, ils  
15 offrent au producteur et au législateur la garantie qu'ils n'auront pas d'avantage sélectif en cas de dissémination accidentelle dans l'environnement.

Selon un aspect de l'invention, un premier type de mutant ou cellule transformée nommé ICONE 100 est décrit,  
20 qui porte une mutation dans le gène *tnaA* entraînant une perte de l'activité tryptophanase. Le phénotype associé à cette mutation est l'absence de dégradation du tryptophane. Ce type de mutant, après transformation par un vecteur rapporteur et culture sur un milieu favorisant  
25 habituellement l'activité tryptophanase, s'avère supérieur à l'isolat dont il est issu en termes de contrôle de la répression par le tryptophane.

Selon un autre aspect de l'invention, un second type de mutant nommé ICONE 200 est décrit, qui porte une  
30 cassette d'expression du gène *trpR* sous le contrôle du promoteur de la tryptophanase *P<sub>tna</sub>*, intégrée au locus du gène *tnaA*. L'utilisation du locus *tna* comme cible pour l'intégration entraîne chez la bactérie hôte une perte de l'activité tryptophanase qui se traduit comme décrit  
35 précédemment par une incapacité à convertir le tryptophane en indole. Par ailleurs, la présence de la cassette *P<sub>tna</sub>::trpR* dans le chromosome confère à ce nouveau gène *trpR* les caractéristiques de *P<sub>tna</sub>*, c'est à

dire une sensibilité à la répression catabolique (Isaacs, Chao, Yanofsky, & Saier. 1994; Botsford & DeMoss. 1971) et l'inductibilité par le tryptophane (Stewart & Yanofsky. 1985). Cette dernière propriété constitue une  
5 innovation dans laquelle le promoteur Ptrp plasmidique est contrôlé au niveau de la transcription par un promoteur chromosomique, Ptna, qui lui est antagoniste. De manière surprenante, après transformation par un vecteur d'expression et culture en fermenteur, ICONE 200  
10 s'avère supérieur à l'isolat dont il est issu en termes de contrôle de la répression par le tryptophane.

Les bactéries présentant une des caractéristiques mentionnées ci-dessus sont utiles pour la production maîtrisée de molécules recombinantes. Aussi, la présente  
15 invention a également pour objet l'utilisation desdites bactéries transformées dans un procédé de production de protéines recombinantes.

Dans les exemples ci-dessous, l'avantage apporté par les deux mutants est clairement démontré en utilisant  
20 comme protéine recombinante la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli*.

Un autre aspect de l'invention réside dans les caractéristiques des mutations introduites. Celles-ci sont parfaitement définies, contrôlées sur le plan  
25 génétique et biochimique, ciblées au locus tna d'*E. coli* et exemptes de marqueur de sélection.

Les microorganismes mutants ou transformés de l'invention sont construits à partir de procaryotes, plus précisément de bactéries Gram-négatives appartenant à  
30 l'espèce *Escherichia coli*. Les propriétés du promoteur de l'opéron tryptophanase d'*E. coli* (inductible par le tryptophane, sensible à la répression catabolique) ont été utilisées pour diriger la synthèse transitoire d'un médiateur agissant négativement sur l'expression dirigée  
35 par Ptrp. Cependant, il est connu que d'autres espèces bactériennes, en particulier celles qui colonisent le tractus intestinal des animaux, sont capables de synthétiser une tryptophanase inductible par le



tryptophane (Snell. 1975). Par conséquent, d'autres souches que *E. coli* conviennent pour pratiquer les méthodes décrites et y produire des protéines recombinantes.

- 5 Les exemples et les figures qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Légendes des figures :

- 10 FIGURE 1: cinétiques de croissance des souches RV308, ICONE 100 et ICONE 200 x pVA- $\beta$ gal  
DO 580 nm correspond à la mesure de la densité optique mesurée par spectrophotométrie.
- FIGURE 2: cinétiques d'activité  $\beta$ -gal des souches RV308,  
15 ICONE 100 et ICONE 200 x pVA- $\beta$ gal  
Les bactéries transformées par un vecteur contenant le gène de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur P<sub>trp</sub> sont cultivées en fermenteur. L'activité  $\beta$ -galactosidase est mesurée par incubation d'un extrait  
20 cellulaire en présence d'ONPG (substrat spécifique de la  $\beta$ -galactosidase).

L'invention repose sur l'introduction stable de mutations dans le génome de la souche hôte. Toutes les  
25 modifications présentées dans les exemples ci-après sont introduites au locus *tna* d'*E. coli*, constitué schématiquement de l'enchaînement suivant :

- A) promoteur P<sub>tna</sub>,  
B) séquence codante du gène *tnaA* (tryptophanase),  
30 C) région inter-génique  
D) séquence codante du gène *tnaB* (tryptophane-perméase),  
E) terminateur de transcription.

Plus précisément, les modifications portent sur l'élément (B). Celui-ci est remplacé au profit d'un  
35 élément (b) dont les caractéristiques dans les diverses constructions sont les suivantes :

Tableau 1 : nature des mutations portées par ICONE 100 et ICONE 200

| Nom du mutant | Nature de l'élément (b)   |
|---------------|---|
| ICONE 100     | séquence codante de tnaA interrompue en position + 221 par un codon stop et un site de restriction XbaI |
| ICONE 200     | séquence codante du gène trpR codant pour l'apoporépresseur de Ptrp                                     |

5 Exemple 1 : construction du mutant ICONE 100

Un fragment d'ADN noté tnaAT est amplifié par PCR. Il s'étend des positions - 275 à + 1054 par rapport au premier nucléotide de la séquence codante de tnaA. Ce fragment qui chevauche le promoteur Ptna et tnaA est amplifié par réaction PCR en deux parties. La partie I s'étend de la position -275 à la position +220. Elle est amplifiée à l'aide des oligonucléotides Trp5 (sens) et Trp2 (anti-sens) dont la séquence est :

15

Trp5 : 5' -CGGGATCCGTGTGACCTCAAAATGGTT-3'  
BamHI

Trp2 : 3'-CTACGCGCCGCTGCTTCGGATTAGATCTCG-5'  
20 (anti-sens) stop XbaI

La partie II se situe dans la séquence codante de tnaA, immédiatement en 3' de la partie I. Elle s'étend des positions + 221 à + 1054. Elle est amplifiée à l'aide  
25 des oligonucléotides Trp3 et Trp4 :

Trp3 : 5' - CGTCTAGACAGCGGCAGTCGTAGCTAC - 3'  
XbaI

Trp4 : 3'-CCTTCTCTAACCGCAACAGTTCGAACG-5'  
30 (anti-sens) HindIII

Les réactions de PCR sont effectuées en utilisant comme matrice des colonies d'*E. coli* K-12 lysées dans le tampon de la Taq polymérase (AmpliTaq Gold CETUS, USA).

5 Les produits d'amplification sont précipités à l'éthanol puis digérés avec les enzymes de restriction appropriées (BamHI - XbaI pour la partie I, XbaI - HindIII pour la partie II). Une analyse sur gel d'agarose coloré au BET permet de vérifier que les fragments ont la  
10 taille attendue (Deeley & Yanofsky. 1981). Le fragment tnaAT est généré en ligant les deux fragments I et II au site XbaI. Il diffère de la séquence naturelle par la présence d'un codon stop en position + 221 suivi d'un site de restriction XbaI. Ce fragment tnaAT est cloné aux  
15 sites BamHI / HindIII dans le vecteur pRIT28 (Hultman, Stahl, Hornes, & Uhlen. 1989) et séquencé. Le fragment tnaAT est sous-cloné dans le vecteur pMAK705 (Hamilton, Aldea, Washburn, Babitzke, & Kushner. 1989), donnant pMAK705[tnaAT].

20 La méthode employée pour générer un réarrangement génétique chez *E. coli* est celle décrite par Hamilton et al. (1989). Elle est basée sur l'emploi du vecteur suicide pMAK705 qui porte une origine de répllication thermosensible, fonctionnelle à 30 °C mais inactive au-  
25 delà de 42 °C, ainsi que le gène de résistance au chloramphénicol (CMP). *E. coli* RV308 (Maurer, Meyer, & Ptashne. 1980) est transformé par 4 µg du vecteur pMAK705[tnaAT] et le mélange de transformation est étalé sur boîtes de milieu LB + CMP 20 µg/ml. Après incubation  
30 une nuit à 30 °C, trois clones sont repiqués en milieu liquide LB + CMP 20 µg/ml et incubés à 30 °C sous agitation jusqu'à atteindre une DO à 580 nm voisine de 1. Les suspensions sont ensuite étalées sur milieu LB + CMP 20 µg/ml et incubées à 44 °C et à 30 °C. Les colonies qui  
35 se développent à 44 °C (= co-intégrants) sont porteuses d'une intégration chromosomique du vecteur, cette intégration étant favorisée par l'existence d'homologies

de séquence entre le chromosome et l'insert porté par le vecteur.

La phase dite de résolution consiste à favoriser l'excision du vecteur par un mécanisme de recombinaison entre des séquences répétées présentes sur le chromosome. Quelques clones isolés à 44 °C sont cultivés en milieu liquide LB + CMP 20 µg/ml à 30 °C pendant trois jours en renouvelant le milieu régulièrement. Les suspensions sont ensuite diluées, étalées sur milieu gélosé LB + CMP 20 µg/ml et incubées à 30 °C jusqu'à l'apparition de colonies individualisées. Plusieurs dizaines de colonies sont repiquées en double sur milieu gélosé LB + CMP 20 µg/ml à 30 °C et 44 °C. Les colonies qui ne se développent pas à 44 °C sont retenues et criblées par une réaction de PCR indiquant si la résolution du vecteur a conservé le codon stop et le site XbaI au locus *tna*. Les oligonucléotides utilisés sont Trp6 (sens) et Trp7 (anti-sens), respectivement homologues à la mutation désirée et à une partie du terminateur de *tnaA*:

20

Trp6 : 5'-CGACGAAGCCTAATCTAGA-3'  
stop XbaI

25

Trp7 : 3'-CCGATATTCCTACAATCGG-5'  
(anti-sens)

Sur dix-huit clones criblés, neuf donnent un fragment d'amplification de la taille attendue indiquant la présence du codon stop suivi du site XbaI dans le gène *tnaA*. Les neuf autres clones ne donnent pas de produit d'amplification, probablement parce que l'étape de résolution a restauré sur le chromosome le gène *tnaA* non muté. Parmi les neuf clones positifs, quatre sont prélevés et soumis à un curage du plasmide par repiquages successifs en absence de pression de sélection. Après quelques jours de culture, on obtient des clones redevenus sensibles au chloramphénicol.

La présence de la mutation inactivant *tnaA* est confirmée de deux manières différentes : d'abord, une amplification par PCR à l'aide des oligonucléotides Trp5 et Trp4 suivie d'une digestion par XbaI montre que le site de restriction, absent chez *E. coli* RV308, est présent dans le gène *tnaA* des mutants ; ensuite, par une culture des mutants dans un milieu riche en tryptophane suivie du test à l'indole (ajout du réactif de Kovacs dans le milieu de culture), on montre que les mutants n'ont pas généré d'indole alors que la souche RV308 d'origine produit de l'indole dans les mêmes conditions. On en déduit que la mutation introduite entraîne une perte de l'activité tryptophanase.

Un clone est sélectionné en vue d'une conservation sous forme congelée. Il est nommé ICONE 100.

#### Exemple 2 : construction du mutant ICONE 200

Un fragment d'ADN est construit in vitro par amplification PCR de trois sous-unités:

La première sous-unité située dans le promoteur *P<sub>tna</sub>* s'étend des positions - 511 à +3 par rapport au premier nucléotide de la séquence codante de *tnaA*. Elle est amplifiée à partir des oligonucléotides TrpR1 (biotinylé en 5') et TrpR2 :

TrpR1 : 5'-CTGGATCCCTGTCAGATGCGCTTCGC-3'  
BamHI

TrpR2 : 3'-CTTCCTAATACATTACCGGGTTG-5'  
(anti-sens)

La seconde sous-unité correspond à la séquence codante du gène *trpR* d'*E. coli*. Elle est amplifiée à partir des oligonucléotides TrpR3 et TrpR4 (biotinylé en 5') :

TrpR3 : 5'-GTAATGGCCCAACAATCACC-3'  
start

TrpR4 : 3'-CACAACGACTTTTCGCTAACTGACGTCAG-5'  
(anti-sens) PstI

5

La troisième sous-unité correspond à la séquence située immédiatement en 3' de la séquence codante de *tnaA*. Elle contient la région intergénique de l'opéron *tna* et une partie du gène *tnaB* codant pour la tryptophane-perméase. Elle est amplifiée à partir des oligonucléotides TrpR5 et TrpR6 :

TrpR5 : 5'-CGCTGCAGTTATAATACTACAGAGTGG-3'  
PstI

15

TrpR6 : 3'-CCAGCTAATGAGGTAAGTTCGAAC-5'  
(anti-sens) HindIII

Les fragments amplifiés sont purifiés selon la méthode GeneClean (Bio101, La Jolla, CA, USA).

Les sous-unités I et II sont fusionnées de la manière suivante. Dans deux tubes séparés, chaque sous-unité est mise en incubation avec 30 µl de billes marquées à la streptavidine (Dynabeads, DYNAL, Norvège). Après 20 min à 37 °C et 5 min à température ambiante, l'ADN fixé est dénaturé par 50 µl de NaOH 0,15 M. Les ADN simple-brin récupérés dans chaque surnageant sont mélangés à parts égales et soumis à une réaction d'hybridation et d'extension en présence de la Taq polymérase (AmpliTaq Gold, CETUS, USA) suivant cinq cycles de PCR. Le produit de la réaction est amplifié dans une réaction PCR à l'aide des oligonucléotides TrpR1 et TrpR4.

Le produit d'amplification purifié par GeneClean est digéré par BamHI et PstI. Le fragment ainsi isolé est cloné dans le vecteur pRIT28 pour donner pRIT28[Ptna::trpR], puis séquencé.

La sous-unité III est digérée par les enzymes PstI et HindIII puis clonée dans pRIT28 pour donner pRIT28[3'tna], puis la séquence est vérifiée par séquençage ADN (ABI 373A, Perkin Elmer, USA).

5 Le vecteur pRIT28[Ptna : :trpR] est digéré par les enzymes PstI et HindIII puis ligué en présence de la sous-unité III elle-même isolée à partir de pRIT28[3'tna] par double digestion PstI/HindIII. Le vecteur résultant est nommé pRIT28[Ptna : :trpR : :3'tna]. L'insert est  
10 transféré dans pMAK705 après double digestion par les enzymes BamHI et HindIII. Le plasmide résultant est nommé pMAK705[Ptna : :trpR : :3'tna].

L'intégration de la fusion Ptna : :trpR : :3'tna au locus tna d'*E. coli* RV308 est réalisée dans des  
15 conditions analogues à celles décrites dans l'exemple 1. Brièvement, la souche est transformée par le vecteur pMAK705[Ptna : :trpR : :3'tna] puis soumise aux étapes d'intégration et de résolution.

Le criblage des colonies en fin de résolution fait  
20 appel à des conditions légèrement différentes de celles de l'exemple 1. Le locus tna est amplifié par PCR à partir des oligonucléotides TrpR11 et TrpR7 :

TrpR11 : 5'-GGGCAGGTGAACTGCTGGCG-3'

25

TrpR7 : 3'-GGTGCCGTTATAAGGGTCGGAC-5'  
(anti-sens)

TrpR11 s'hybride avec la séquence de Ptna en amont  
30 (5') de TrpR1, et TrpR7 s'hybride avec la séquence de tnaB, en aval (3') de TrpR6. Le produit d'amplification a une taille différente suivant que le gène placé en aval de Ptna est tnaA (situation rencontrée dans RV308) ou trpR (situation recherchée chez les mutants). Une colonie  
35 possédant trpR au locus tna est conservée et nommée ICONE 200. Une analyse de sa séquence chromosomique montre qu'elle possède le gène trpR immédiatement en aval du promoteur Ptna. Une culture en présence de tryptophane

atteste l'absence de formation d'indole, ce qui est une conséquence logique de la perte du gène *tnaA*.

Exemple 3 : fuite d'expression en présence de succinate + tryptophane

Cet exemple décrit les capacités relatives de *E. coli* RV308, ICONE 100 et ICONE 200 à contrôler l'expression d'une protéine recombinante sous le contrôle du promoteur *P<sub>trp</sub>*. A cet effet, nous avons construit un vecteur d'expression noté pVA- $\beta$ gal dans lequel la séquence codant pour la  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* est placée en aval du promoteur *P<sub>trp</sub>*. Le vecteur d'origine utilisé pour cette construction est pVAABP308 (Murby, Samuelsson, Nguyen, et al. 1995).

Chacune des trois souches est transformée par le vecteur pVA- $\beta$ gal. Les transformants obtenus sont cultivés individuellement dans un milieu complet (Tryptic Soy Broth (DIFCO) 30 g/l, Yeast Extract (DIFCO) 5 g/l) pendant une nuit à 37 °C. Un aliquot de ces précultures est transféré dans 60 ml de milieu M9.YE.SUCC (solution de sels M9 1X (DIFCO), Yeast Extract (DIFCO) 5 g/l, succinate de sodium 20 g/l). Après un temps d'incubation à 37 °C permettant d'atteindre la phase exponentielle de la croissance, un prélèvement est effectué sur chaque culture. La croissance est estimée par la Densité Optique à 580 nm de la suspension bactérienne. Le niveau d'activité  $\beta$ -galactosidase est mesuré dans chaque culot cellulaire. Pour cela, 1 ml de culture est centrifugé 3 min à 12000 g. Le culot cellulaire est repris dans 900  $\mu$ l de tampon (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 - EDTA 1 mM - NaCl 100 mM - lysozyme 400  $\mu$ g/ml) et incubé 15 min à 37 °C. 100  $\mu$ l de SDS (1% dans Tris-HCl 50 mM pH 7,5) sont ajoutés et l'échantillon est placé 5 min à température ambiante. Le dosage s'effectue en mélangeant 30  $\mu$ l d'échantillon, 204  $\mu$ l de tampon (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 - MgCl<sub>2</sub> 1 mM) et 66  $\mu$ l d'ONPG (4 mg/ml dans Tris-HCl 50 mM pH 7,5). Le



mélange réactionnel est placé en incubation à 37 °C. La réaction est stoppée par l'ajout de 500 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. La DO à 420 nm rapportée au temps d'incubation est proportionnelle à l'activité β-galactosidase présente dans l'échantillon. Sachant que *E. coli* RV308 a une délétion complète de l'opéron lac (Maurer, Meyer, & Ptashne. 1980), l'activité β-galactosidase mesurée est uniquement due à l'expression du gène porté par le vecteur pVA-βgal.

Le tableau 2 résume les résultats obtenus avec chacune des souches RV308, ICONE 100 et ICONE 200.

Tableau 2 : croissance des souches RV308, ICONE 100 et ICONE 200 et fuite d'expression (moyenne et écart-type sur trois expériences)

|           | DO 580 nm   | β-GAL (U/ml) |
|-----------|-------------|--------------|
| RV308     | 2,47 ± 0,01 | 0,93 ± 0,09  |
| ICONE 100 | 3,69 ± 0,24 | 0,21 ± 0,03  |
| ICONE 200 | 2,43 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00  |

Les résultats du tableau 2 montrent que les mutants de la lignée ICONE se développent au moins aussi bien que la souche RV308 dont ils sont issus. Les mutations introduites n'ont donc pas d'effet négatif sur la croissance. Par ailleurs, l'activité β-galactosidase mesurée est différente chez les trois souches. ICONE 100 possède une activité intracellulaire environ 4,5 fois inférieure à celle de RV308. Dans des conditions - succinate comme source de carbone - où l'activité du promoteur Ptna est maximale (Botsford & DeMoss. 1971), la délétion du gène de la tryptophanase conduit donc à une réduction de la fuite d'expression, probablement en limitant la dégradation du tryptophane intracellulaire (co-répresseur). Dans ces mêmes conditions, le niveau de

fuite d'expression chez ICONE 200 est encore diminué d'un facteur 10 par rapport à ICONE 100. L'activité du promoteur P<sub>trp</sub> plasmidique est donc minimale chez ICONE 200. D'une part, la perte de l'activité tryptophanase  
 5 donne à la bactérie la possibilité de mieux contrôler P<sub>trp</sub> comme cela est démontré pour ICONE 100. Mais ICONE 200 possède une seconde caractéristique qui la distingue d'ICONE 100 sur le plan génétique et lui donne au niveau expérimental un avantage supplémentaire en termes de  
 10 contrôle de l'expression. Ainsi, dans des conditions où P<sub>tna</sub> est actif, ICONE 200 a la possibilité de diriger la surexpression de l'apoprésenseur T<sub>prR</sub> et par conséquent la fuite d'expression mesurée au niveau du promoteur P<sub>trp</sub> plasmidique est réduite d'un facteur proche de 50 par  
 15 rapport à la souche d'origine RV308.

Exemple 4 : fuite d'expression en présence de glycérol + tryptophane

20 Cet exemple démontre l'avantage apporté par le mutant ICONE 200 dans un milieu de culture et des conditions de fermentation proches de celles qui pourraient être utilisées industriellement pour produire des protéines recombinantes avec le système P<sub>trp</sub>.

25 Chacune des trois souches RV308, ICONE 100 et ICONE 200 est transformée par le vecteur pVA-βgal. Les transformants obtenus sont cultivés individuellement dans 200 ml de milieu complet (Tryptic Soy Broth (DIFCO) 30 g/l, Yeast Extract (DIFCO) 5 g/l) pendant une nuit à 37  
 30 °C.

La suspension cellulaire obtenue est transférée stérilement dans un fermenteur (modèle CF3000 de Chemap, capacité 3,5 l) contenant 1,8 litres du milieu suivant (concentrations pour 2 litres de culture finale) :  
 35 glycérol 90 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g/l, Na<sub>3</sub>-citrate 2H<sub>2</sub>O 9 g/l, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 2 g/l, extrait de levure 1 g/l, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 30 mg/l, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 8 mg/l, CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 7 mg/l, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 7 mg/l, MnSO<sub>4</sub> 1H<sub>2</sub>O 10

mg/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2 mg/l, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 8 mg/l, FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 54 mg/l, antimousse 0,06 %, tétracycline 8 mg/l, tryptophane 200 mg/l . Le pH est régulé à 7,0 par ajout d'ammoniaque. Le taux d'oxygène dissous est maintenu à 30% de la saturation par asservissement de la vitesse d'agitation puis du débit d'aération à la mesure de l'O<sub>2</sub> dissous. Lorsque la Densité Optique de la culture atteint une valeur comprise entre 40 et 45, on procède à l'induction par l'ajout de 25 mg/l d'acide indole-acrylique (SIGMA).

Une analyse en cinétique de la densité optique de la culture (DO à 580 nm de la suspension) et de l'activité  $\beta$ -galactosidase intracellulaire (voir exemple 3) est effectuée. Les figures 1 et 2 illustrent respectivement les cinétiques de croissance et d'activité  $\beta$ -galactosidase des trois cultures.

Les données présentées en figure 1 confirment l'observation de l'exemple 3 : les trois souches ont des cinétiques de croissance comparables. Les mutants de la lignée ICONE ont de ce point de vue conservé le potentiel de croissance de *E. coli* RV308 et ils demeurent donc des candidats potentiels pour une utilisation industrielle.

Les données de la figure 2 montrent l'impact des mutations portées par les souches ICONE sur l'expression de la  $\beta$ -galactosidase en fermenteur. Clairement, sur un milieu à base de glycérol, la présence ou l'absence de l'activité tryptophanase n'a pas d'effet sur le contrôle de l'expression comme en atteste la première partie des courbes RV308 et ICONE 100, même si l'on constate que le tryptophane exogène disparaît plus rapidement dans la culture RV308 que dans celle d'ICONE 100 (données non présentées). En revanche, le mutant ICONE 200 présente de meilleures capacités à contrôler l'expression en début de culture : l'activité  $\beta$ -galactosidase reste faible pendant les 18 premières heures de culture puis commence à augmenter à partir de  $t = 20$  h, moment où la concentration en tryptophane extracellulaire devient nulle (données non présentées). La deuxième partie de la

courbe concernant ICONE 200 montre que l'activité  $\beta$ -galactosidase augmente régulièrement pour atteindre un niveau en fin de culture proche de celui obtenu avec RV308. En cela, nous démontrons que le système de  
5 régulation présent chez ICONE 200 apporte un contrôle transitoire du promoteur P<sub>trp</sub> plasmidique. Ce contrôle, exercé par le tryptophane et/ou la source de carbone, devient inopérant dans la deuxième partie de la culture et ne vient pas s'opposer à une expression maximale de la  
10 protéine recombinante.

# Bibliographie

- 5 Botsford, J.L., & DeMoss, R.D. (1971). Catabolite repression of tryptophanase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 105, 303-312.
- 10 Deeley, M.C., & Yanofsky, C. (1981). Nucleotide sequence of the structural gene for tryptophanase of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 147, 787-796.
- 15 Gunsalus, R.P., Yanofsky, C. (1980). Nucleotide sequence and expression of *E. coli* *trpR*, the structural gene for the *trp* aporepressor. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 77, 12, 7117-7121.
- 20 Gunsalus, R.P., Gunsalus Miguel, A., & Gunsalus, G.L. (1986). Intracellular *Trp* repressor levels in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 167, 272-278.
- 25 Hamilton, C.M., Aldea, M., Washburn, B.K., Babitzke, P., & Kushner, S.R. (1989). New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 171, 4617-4622.
- 30 Hasan, N., & Szybalski, W. (1995). Construction of *lacI*<sup>ts</sup> and *lacI*<sup>qts</sup> expression plasmids and evaluation of the thermosensitive *lac* repressor. *Gene*, 163, 35-40.
- 35 Hultman, T., Stahl, S., Hornes, E., & Uhlen, M. (1989). Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. *Nucleic Acids Research*, 17, 4937-4946.
- Isaacs, H., Chao, D., Yanofsky, C., & Saier, M.H. (1994). Mechanism of catabolite repression of tryptophanase synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 140, 2125-2134.

Kelley, R.L., & Yanofsky, C. (1982). trp aporepressor production is controlled by autogenous regulation and inefficient translation. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 79, 3120-3124.

5

Maurer, R., Meyer, B.J., & Ptashne, M. (1980). Gene regulation at the right operator (OR) of bacteriophage lambda. I. OR3 and autogenous negative control by repressor. Journal of Molecular Biology, 139, 147-161.

10

Murby, M., Samuelsson, E., Nguyen, T.N., Mignard, L., Power, U., Binz, H., Uhlen, M., & Stahl, S. (1995). Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus. European Journal of Biochemistry, 230, 38-44.

15

Nichols, B.P., & Yanofsky, C. (1983). Plasmids containing the trp promoters of Escherichia coli and Serratia marcescens and their use in expressing cloned genes. Methods in Enzymology, 101, 155-164.

20

Snell, E.E. (1975). Tryptophanase : structure, catalytic activities, and mechanism of action. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 42, 287-333.

25

Stark, M.J.R. (1987). Multicopy expression vectors carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in Escherichia coli. Gene, 51, 255-267.

30

Stewart, V., & Yanofsky, C. (1985). Evidence for transcription antitermination control of tryptophanase operon expression in Escherichia coli K-12. Journal of Bacteriology, 164, 731-740.

35

Suter-Crazzolara, C., & Unsicker, K. (1995). Improved expression of toxic proteins in *E. coli*. *BioTechniques*, 19, 202-204.

- 5 Yanofsky, C. et al. (1981). The complete nucléotide sequence of the tryptophan operon of *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 9, 24, 6647-6668.

- 10 Yansura, D.G., & Bass, S.H. (1997). Application of the *E. coli* trp promoter. *Methods in Molecular Biology*, 62, 55-62.

- 15 Yansura, D.G., & Henner, D.J. (1990). Use of *Escherichia coli* trp promoter for direct expression of proteins. In Anonymous, *Methods in Enzymology*. (pp. 54-60). San Diego, CA: Academic Press, Inc.

## REVENDICATIONS

1. Construction pour l'expression d'un gène codant pour une protéine recombinante d'intérêt placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron tryptophane P<sub>trp</sub> dans une cellule hôte procaryote, caractérisée en ce que la construction comprend une séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte.
2. Construction selon la revendication 1, caractérisée en ce que la cellule hôte procaryote est une bactérie Gram négative.
3. Construction selon la revendication 1, caractérisée en ce que la cellule hôte procaryote est *E. coli*.
4. Construction selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre en amont de ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte, tout ou partie de la séquence nucléique du promoteur P<sub>tna</sub> de l'opéron tryptophanase.
5. Construction selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte comprend un fragment muté de la séquence codante de ladite tryptophanase TnaA.
6. Construction selon la revendication 5, caractérisée en ce que ledit fragment muté est obtenu par l'insertion d'un codon stop à une position telle que



la séquence du fragment muté ainsi obtenu code pour un fragment protéique dépourvu d'activité tryptophanase.

7. Construction selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que ledit fragment muté est un fragment mutée de la séquence codante de la tryptophanase TnaA de ladite cellule hôte.
8. Construction selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte comprend une séquence nucléique comprenant tout ou partie de la séquence d'un promoteur suivie en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp.
9. Construction selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp est tout ou partie du promoteur Ptna de l'opéron tryptophanase d'*E. coli*.
10. Construction selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp est la séquence codant pour l'apoprésenseur TrpR de l'opéron tryptophane d'*E. coli* ou un de ses fragments biologiquement actifs.
11. Vecteur contenant une construction selon l'une des revendications 1 à 10.

12. Vecteur selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pMAK705[tnaAt] ou du vecteur pMAK705[Ptna::trpR::3'tna].
- 5 13. Cellule hôte procaryote transformée par un vecteur selon l'une des revendications 11 à 12.
14. Cellule hôte procaryote selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'*E. coli*.
- 10 15. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt dans une cellule hôte utilisant une construction selon l'une des revendications 1 à 10.
- 15 16. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon la revendication 15, dans lequel ladite construction est introduite dans l'ADN de la cellule hôte procaryote.
- 20 17. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon la revendication 15 ou 16, dans lequel ladite construction est introduite dans l'ADN de la cellule hôte procaryote par un vecteur selon la revendication 11 ou 12.
- 25 18. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 15 à 17, dans lequel ladite construction est introduite dans l'ADN de la cellule hôte procaryote selon la méthode
- 30 d'intégration chromosomique décrite dans l'exemple 1 ou 2.
- 35 19. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 15 à 18, dans lequel ladite construction est introduite sans autre élément d'ADN qui permettrait d'y associer un avantage sélectif.

20. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 15 à 19, dans lequel ladite construction est introduite au locus de l'opéron tryptophanase d'*E. coli*.

5

21. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

10 a) la transformation d'une cellule procaryote par un vecteur selon la revendication 11 ou 12, et l'intégration de ladite construction dans l'ADN de ladite cellule hôte ;

15 b) la transformation de ladite cellule procaryote par un vecteur contenant un gène codant pour ladite protéine recombinante d'intérêt

c) la culture de ladite cellule transformée dans un milieu de culture permettant l'expression de la protéine recombinante; et

20 d) la récupération de la protéine recombinante à partir du milieu de culture ou de ladite cellule transformée.

22. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon la revendications 21, caractérisé en ce que ledit procédé comprend en outre entre l'étape a) et b), une étape de résolution et de criblage.

23. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 15 à 22, dans lequel le contrôle de l'expression des protéines recombinantes avant induction du promoteur *P<sub>trp</sub>* est obtenu par l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur *P<sub>trp</sub>* selon l'une des revendications 8 à 10.

24. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon la revendication 23, dans lequel

l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence  
nucléique codant pour une molécule de nature  
ribonucléotidique ou protéique agissant négativement  
sur le promoteur Ptrp selon l'une des revendications 8  
5 à 10 est obtenue par tout moyen permettant d'exercer  
un effet inhibiteur ou activateur sur ledit promoteur.

25. Procédé de production selon la revendication 24,  
dans lequel l'induction dudit promoteur suivi en 3'  
10 d'une séquence nucléique codant pour une molécule de  
nature ribonucléotidique ou protéique agissant  
négativement sur le promoteur Ptrp selon l'une des  
revendications 8 à 10 est obtenue soit:

- 15 a) par le choix d'une source de carbone appropriée  
dans le milieu de culture; soit
- b) par l'ajout de tryptophane dans le milieu de  
culture; ou
- c) par une combinaison de a) et b).

**ORIGINAL**

**CABINET REGIMBEAU**  
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
26, Avenue Kléber  
75116 PARIS

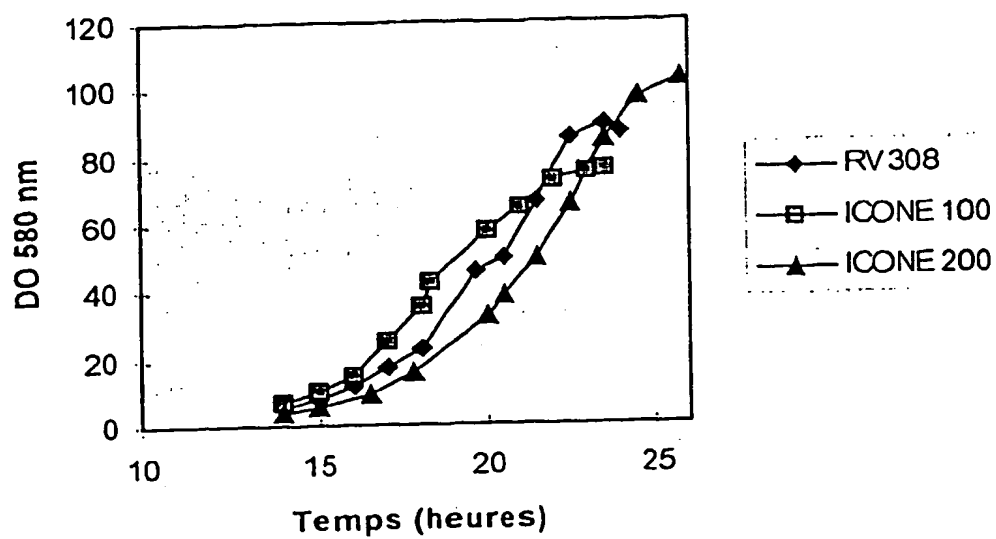


Figure 1

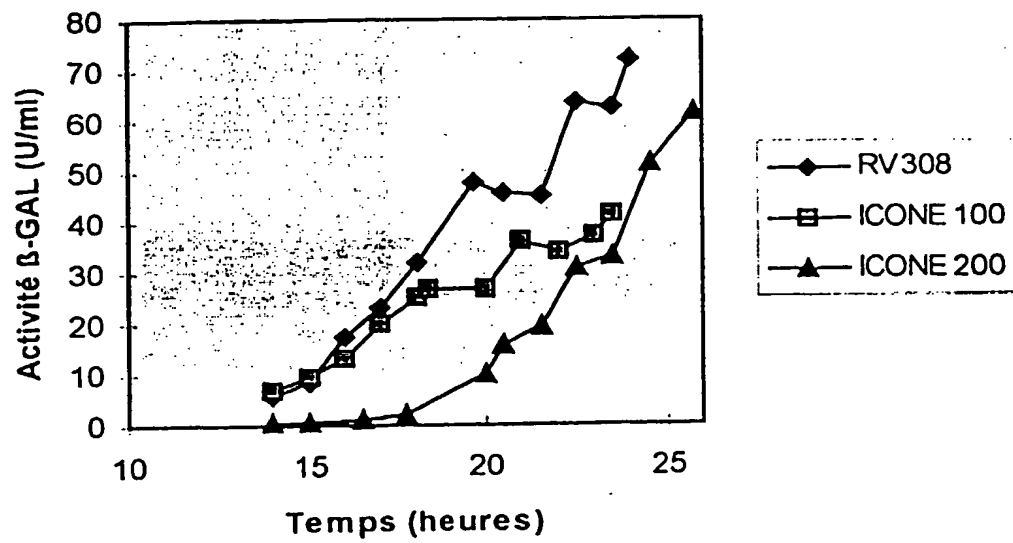


Figure 2